

Analisis Filogenetik Gen Hemaglutinin dan Neuraminidase Avian Influenza H9N2 Asal Ayam Petelur di Jawa Timur

*(PHYLOGENETIC ANALYSIS OF HAEMMAGLUTININ AND NEURAMINIDASE
GENES OF AVIAN INFLUENZA H9N2 FROM LAYER INI EAST JAVA)*

**Prestalia Dwi Rachmawati¹, Tatang Santanu Adikara²,
Hani Plumeriastuti³, Rahaju Ernawati⁴, Jola Rahmahani⁴,
Didik Handijatno⁴, Christian Marco Hadi Nugroho⁵**

¹Program Magister, Ilmu Penyakit dan Kesehatan Masyarakat Veteriner,

²Departemen Anatomi Veteriner, ³Departemen Patologi Veteriner,

⁴Departemen Mikrobiologi Veteriner,

Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga

⁵Program Doktor, Ilmu Biomedik,

Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia

Kampus C Unair, Jl. Mulyorejo, Kota Surabaya,

Jawa Timur, Indonesia 60115

Telpon +62 31 5992785, 5993016; Fax. +62 31 5993015

Email: prestaliadwirachmawati@gmail.com

ABSTRAK

Virus flu burung atau virus *avian influenza* (VAI) subtipe H9N2 merupakan salah satu agen infeksius yang mengancam peternakan unggas petelur, karena berdampak pada penurunan produksi secara drastis dalam satu populasi. Tujuan penelitian ini adalah mengisolasi serta menganalisis secara filogenetik gen parsial penyandi protein permukaan VAI subtipe H9N2 dari peternakan ayam petelur di Jawa Timur. Sebanyak 30 sampel terduga VAI subtipe H9N2 diambil dari peternakan ayam petelur yang mengalami penurunan produksi hingga 70% di tiga Kecamatan masing-masing di Kabupaten Kediri, Kabupaten Blitar dan Kabupaten Tulungagung, Provinsi Jawa Timur. Virus diisolasi pada telur ayam berembrio (TAB) yang kemudian dilanjutkan dengan uji Hemaglutinasi (HA). Deteksi keberadaan gen H9 dan N2 dilakukan melalui *Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) dan dilanjutkan dengan sekuensing gen parsial dari kedua protein permukaan tersebut. Analisis data diolah menggunakan BioEdit version 7.2.5 dan Mega 7.0. Hasil menunjukkan bahwa hanya satu sampel yakni dengan kode B2.2 asal Blitar yang merupakan VAI subtipe H9N2. Virus yang diisolasi pada penelitian ini masuk dalam *clade* h9.4.2.5 dari VAI subtipe H9N2. Kesimpulan dari penelitian ini adalah VAI subtipe H9N2 berhasil diisolasi dari peternakan ayam petelur di Jawa Timur dan berhasil diidentifikasi secara filogenetik.

Kata-kata kunci: H9N2; RT-PCR; sekuensing; Jawa Timur; ayam petelur

ABSTRACT

Avian influenza virus (AIV) subtype H9N2 is one of the infectious agents that threatens laying poultry farms, because it has an impact on drastically reducing production in the population. The aim of this study was to isolate and analyze phylogenetically the partial gene encoding the surface proteins of the AIV subtype H9N2 from laying hens in East Java. A total of 30 suspected AIV subtypes of H9N2 were taken from laying hens which had decreased production by up to 70% in three sub districts each in Kediri, Blitar and Tulung Agung regency, in East Java Province. The virus was isolated in embryonated chicken eggs and then followed by a Hemagglutination (HA) test. Detection of the presence of H9 and N2 genes was carried out through *Reverse Transcriptase polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) and continued with partial gene sequencing of the two surface proteins. Data analysis was processed using BioEdit version 7.2.5 and Mega 7.0. The results show that only one sample, namely code B2.2 from Blitar regency, is an AIV subtype of H9N2. The virus in this study belong to *clade* h9.4.2.5 of the AIV subtype H9N2. The conclusion of this study is that the VAI subtype H9N2 was successfully isolated from laying hens in East Java and successfully identified phylogenetically.

Key words: H9N2; RT-PCR; sequencing; East Java; laying hens

PENDAHULUAN

Flu burung atau *Avian Influenza* termasuk penyakit infeksi viral akut yang dapat menyerang segala jenis unggas dan dari segala umur unggas. Berdasarkan perbedaan bagian Hemaglutinin (H1-18) dan Neuraminidase (N1-N10), *avian influenza* terbagi dalam beberapa sub tipe, masing-masing sub tipe memiliki tingkat patogenitas yang beragam mulai dari *Low Pathogenic Avian Influenza* (LPAI) hingga *High Pathogenic Avian Influenza* (HPAI). Meskipun demikian, baik LPAI dan HPAI sama-sama mampu memengaruhi kesehatan unggas. Adanya mutasi gen melalui *antigenic drift* dan *antigenic shift* dapat mengakibatkan perubahan gejala dari semula LPAI yang terkadang tidak begitu merugikan menjadikannya sangat merugikan dunia perunggasan (Cattoli *et al.*, 2011).

Salah satu sub tipe virus *avian influenza* yang mengancam dunia peternakan ayam petelur adalah sub tipe H9N2 (Alexander, 2007). Di negara wabah flu burung seperti China, virus *avian influenza* sub tipe H9N2 mengakibatkan kerugian yang cukup besar oleh karena morbiditas virus ini mencapai 100% pada peternakan ayam petelur terinfeksi (Sun dan Liu, 2015). Ayam petelur yang terinfeksi flu burung mengalami penurunan nafsu makan disertai penurunan produksi secara drastis. Infeksi virus tersebut biasa diperparah oleh adanya infeksi sekunder dari bakteri maupun virus lain, sehingga mengakibatkan kematian tinggi pada populasi ayam petelur terinfeksi (Zhang *et al.*, 2008). Infeksi virus H9N2 terkadang tidak terlihat di awal infeksi namun penyebaran virus akan semakin cepat dengan *shedding* melalui tinja atau leleran hidung unggas. Oleh karena sifat tersebut, diagnosis secara cepat dan tepat sangat diperlukan guna mengetahui adanya infeksi virus *avian influenza* pada suatu peternakan, sehingga dapat ditentukan tindakan dalam mengatasi infeksi virus H9N2 tersebut.

Sub tipe H9N2 merupakan virus RNA yang memiliki delapan segmen, dan masing-masing memiliki gen penyandi protein virus. Di sisi lain, virus tersebut juga lebih mudah bermutasi dibandingkan dengan virus DNA (Noda *et al.*, 2006). Diagnosis melalui *Polymerase Chain Reaction* (PCR) hingga sekuensing gen virus H9N2 perlu dilakukan untuk mengetahui homologi antara virus dalam vaksin dengan virus yang beredar di lapangan, sebab apabila

virus yang beredar memiliki homologi rendah dengan vaksin, dapat mengakibatkan ketidak-efektifan vaksin yang digunakan oleh karena tetap terjadinya *shedding* virus (Chen *et al.*, 2014).

Pada virus *avian influenza*, terdapat dua segmen virus yang penting dikarakterisasi, yakni Hemaglutinin dan Neuraminidase yang merupakan segmen keempat dan keenam. Pada virus *avian influenza*, Hemaglutinin berfungsi pada awal infeksi berupa *attachment* virus pada reseptor inang, sedangkan neuraminidase berfungsi memecah asam sialat virus dan glikokonjugasi sel inang pada akhir siklus hidup virus ketika virus matang dan akan dilepaskan dari sel inang yang terinfeksi (Liu *et al.*, 2003). Neuraminidase juga berperan di dalam spesifisitas VAI terhadap inang, yaitu berperan untuk menghidrolisis ikatan antara galaktosa dan N-acetylneuraminic pada rantai ujung oligosakarida-glikoprotein. Adanya mutasi pada gen neuraminidase mampu meningkatkan virulensi dan patogenitas dari virus (Uhlendorff, 2009).

Selain melihat karakterisasi virus secara genetik, pengujian secara biologis juga menjadi hal yang penting dalam menentukan virulensi virus *avian influenza*. Beberapa cara yang biasa digunakan adalah inokulasi virus pada telur ayam berembrio hingga inokulasi pada inang menggunakan ayam *specific pathogen free* atau SPF (Qingfeng *et al.*, 2016). Zhu *et al.*, (2015) menyatakan bahwa adanya mutasi gen dari virus mengubah sifat biologis virus tersebut pada inang.

Provinsi Jawa Timur merupakan salah satu provinsi di Indonesia yang memiliki beberapa kabupaten yang cukup padat populasi peternakan ayam petelur, di antaranya Kabupaten Kediri, Kabupaten Blitar, Kabupaten Malang, Kabupaten Tulungagung dan beberapa kabupaten lainnya (Zalizar *et al.*, 2016). Padatnya peternakan ayam petelur di suatu wilayah mengakibatkan mudahnya virus *avian influenza* menyebar dan bermutasi. Di Indonesia, keberadaan virus *avian influenza* sub tipe H9N2 belum pernah dilaporkan secara jelas namun berdasarkan data, *Genbank* menyatakan bahwa sub tipe tersebut telah mewabah pada peternakan ayam petelur di beberapa wilayah di Indonesia. Oleh karena itu *surveillance* merupakan tindakan yang perlu dilakukan untuk mengetahui keberadaan virus *avian influenza* sub tipe H9N2 pada peternakan ayam petelur yang mengalami penurunan produksi secara drastis, termasuk di beberapa kabupaten di Jawa Timur.

METODE PENELITIAN

Koleksi Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah ulas/*swab* kloaka ayam petelur yang mengalami penurunan produksi. Metode pengambilan sampel yang digunakan adalah *purposive sampling*, dan ditujukan pada peternakan ayam petelur yang mengalami penurunan produksi antara 40% hingga 70%. Sejumlah 30 *swab* kloaka diambil dari masing-masing tiga peternakan ayam petelur di tiga Kecamatan di tiap kabupaten yakni Kabupaten Kediri, Kabupaten Blitar dan Kabupaten Tulungagung (Tabel 1). Pengambilan Sampel dilakukan secara acak dengan mengusap *cotton swab* pada bagian dalam kloaka unggas sedalam ± 2 cm. Hasil olesan *cotton swab* dimasukkan ke dalam tabung 1,5 ml yang berisi media transport *phosphate buffer saline/PBS glycerol*. Sampel diberi label, lalu disimpan dalam *freezer* supaya virus tetap hidup.

Propagasi Virus pada Telur Ayam Berembrio

Sampel *swab* kloaka ditumbuhkan pada telur ayam yang berembrio *Specific Pathogen Free/SPF* (PT. Vaksindo Satwa Nusantara, Bogor, Indonesia) umur 11 hari dengan jumlah TAB yang diinokulasikan adalah tiga butir per sampel *swab*. Inokulum dibuat dengan mencampur sampel usap kloaka dengan media PBS 10 μ L dengan kandungan 2×10^6 U/L penisilin dan 200 mg/L streptomisin. Inokulum diinokulasikan pada ruang alantois TAB SPF setelah tiga menit inkubasi. Setelah inokulasi, telur diinkubasi suhu 37°C, dan diamati setiap hari selama empat hari, hingga di hari ke-4 dipanen semua alantoisnya. Telur yang embrionya mati sebelum empat hari dan embrio yang hidup sampai empat hari diuji cairan alantoisnya menggunakan sel darah merah (SDM) ayam 1% dengan uji hemaglutinasi (HA).

Isolasi RNA dan Identifikasi Subtipe Virus Avian Influenza (AI) H9N2

Isolasi RNA dilakukan dengan menggunakan Trizol® LS Reagent (Invitrogen) sesuai petunjuk penggunaannya. Identifikasi subtipe virus AI dilakukan dengan menggunakan *Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR). Volume total reaksi PCR sebanyak 50 μ L, terdiri dari 5 μ L RNA

template, 25 μ L 2x MyTaq one step mix, 0,5 μ L reverse transcriptase, 1 μ L Ribosafe RNase inhibitor, 15,5 μ L DEPC-H₂O (MyTaq™ One-Step RT-PCR Kit, Bionline), 8 μ L primer (Tabel 2). Proses amplifikasi terdiri dari 40 siklus diawali dengan *reverse transcription* pada suhu 48°C selama 20 menit lalu *polymerase activation* pada suhu 95 selama dua menit, selanjutnya proses amplifikasi dengan suhu denaturasi 95 selama 10 detik, *annealing* pada suhu 56 selama 10 detik, ekstensi pada suhu 72 selama 30 detik dan pada akhir amplifikasi dilanjutkan dengan final ekstensi pada suhu 72 selama 10 menit. Untuk identifikasi subtipe virus (Tabel 2), setiap isolat diamplifikasi dengan primer H9 (Chaharain *et al.*, 2009) dan N2 (Abid *et al.*, 2017). Adanya pita DNA spesifik hasil PCR diidentifikasi dengan elektroforesis pada gel agarosa 2%.

Sekuensing Gen Parsial dari Hema-glutinin dan Neuraminidase

Sampel yang positif subtipe H9N2 pada RT-PCR, dilanjutkan dengan amplifikasi dan sekuensing gen neuraminidase (HA) menggunakan dengan MyTaq™ One-Step RT-PCR Kit (Bionline) menggunakan primer yang sama dengan PCR sebelumnya. Volume total reaksi PCR sebanyak 50 μ L. Sampel yang telah diamplifikasi selanjutnya divisualisasi dengan elektroforesis dalam 1,5% gel agarose dan pewarnaan menggunakan ethidium bromida 0,5 μ g/mL. *Marker* yang digunakan 100 bp (Invitrogen) sebagai ukuran standar. Pengamatan dilakukan menggunakan ultra violet/UV transiluminator. Sampel positif disekuensing oleh lembaga jasa 1st Base, Malaysia (melalui PT. Genetika Science Indonesia, Jakarta Pusat).

Analisis Data

Data primer dilakukan analisis filogenik dengan data sekunder yang didapatkan dari *genbank* dengan informasi asal negara dan kode akses (*accession number*). Analisis filogenik dan jarak genetik dilakukan dengan metode *neighbor-joining* dengan metode *bootstrap* (1000 kali pengulangan). Analisis menggunakan perangkat lunak (*software*) yaitu *Molecular Evolutionary Genetics Analysis* atau MEGA versi 7.0 serta Bioedit versi 7.2.5. Seluruh data yang diperoleh dari hasil penelitian ditampilkan dalam bentuk gambar dan tabel untuk dianalisis secara deskriptif.

Tabel 1. Data sampel penelitian yang diambil berdasarkan *purposive sampling*.

Kode Sampel	Asal Sampel		Umur Ayam (Minggu)	Waktu Koleksi Sampel
	Kecamatan	Kabupaten		
B1.1	Srengat	Blitar	27	Desember 2017-Januari 2018
B1.2	Srengat	Blitar	31	Desember 2017-Januari 2018
B1.3	Srengat	Blitar	45	Desember 2017-Januari 2018
B2.1	Ponggok	Blitar	62	Desember 2017-Januari 2018
B2.2	Ponggok	Blitar	33	Desember 2017-Januari 2018
B2.3	Ponggok	Blitar	42	Desember 2017-Januari 2018
B3.1	Kademangan	Blitar	41	Desember 2017-Januari 2018
B3.2	Kademangan	Blitar	55	Desember 2017-Januari 2018
B3.3	Kademangan	Blitar	36	Desember 2017-Januari 2018
K1.1	Ringinrejo	Kediri	36	Januari 2018
K1.2	Ringinrejo	Kediri	38	Januari 2018
K1.3	Ringinrejo	Kediri	54	Januari 2018
K2.1	Pare	Kediri	50	Januari 2018
K2.2	Pare	Kediri	29	Januari 2018
K2.3	Pare	Kediri	27	Januari 2018
K3.1	Ngancar	Kediri	27	Januari 2018
K3.2	Ngancar	Kediri	55	Januari 2018
K3.3	Ngancar	Kediri	45	Januari 2018
T1.1	Rejotangan	Tulung Agung	55	Februari 2018
T1.2	Rejotangan	Tulung Agung	28	Februari 2018
T1.3	Rejotangan	Tulung Agung	29	Februari 2018
T2.1	Kalidawir	Tulung Agung	35	Februari 2018
T2.2	Kalidawir	Tulung Agung	31	Februari 2018
T2.3	Kalidawir	Tulung Agung	45	Februari 2018
T3.1	Ngunut	Tulung Agung	42	Februari 2018
T3.2	Ngunut	Tulung Agung	45	Februari 2018
T3.3	Ngunut	Tulung Agung	56	Februari 2018

Tabel 2. Daftar Primer judul terlalu pendek mohon diperpanjang agar lbh jelas

Gen	Sekuen basa	Amplikon (bp)	Suhu annealing
H9^a	(F) 5'-ATCGGCTGTTAATGGAATGTGTT-3'	221	56
	(R) 5'-TGGGCGTCTTGAATAGGGTAA-3'		
N2^b	(F) 5'-CTCCAATAGACCCGTA CTAT-3'	460	56
	(R) 5'-CCTGAAGTCCCACAAAATAC-3'		

Keterangan: ^aH9 (Chaharaein *et al.* 2009), ^bN2 (Abid *et al.*, 2017)

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil Isolasi pada Telur Ayam Berembrio (TAB) SPF

Dalam mendiagnosis infeksi VAI, propagasi pada telur ayam berembrio merupakan langkah pertama yang harus dilakukan (Kammon *et al.*, 2015). Propagasi merupakan suatu tindakan menumbuhkan atau memperbanyak agen penyakit sehingga didapatkan agen dalam jumlah cukup banyak untuk proses identifikasi lebih jauh melalui metode yang mutakhir. Hasil propagasi menunjukkan bahwa 12 dari 27 sampel penelitian menyebabkan kematian embrio dengan waktu kematian embrio yang beragam. Sampel dengan kode B3.1 dan K3.2 menyebabkan kematian embrio pada 24 hingga 48 jam pascainokulasi, sedangkan 10 sampel lainnya menyebabkan kematian embrio antara 49 hingga 96 jam pascainokulasi. Kematian embrio diduga disebabkan oleh adanya infeksi virus yang mampu menghambat sistem metabolisme embrio, sehingga embrio tidak mampu berkembang sempurna bahkan mengalami kematian. Easterday *et al.* (1997) menyatakan bahwa virus *avian influenza* mampu menyebabkan kematian embrio 24-96 jam pascapropagasi. Hal ini tergantung pada tingkat patogen virus yang menginfeksi. Secara umum *High Pathogenic Avian Influenza* (HPAI) mengakibatkan kematian embrio dalam waktu cukup singkat yakni 24 jam pascapropagasi, sedangkan subtipe yang tergolong dalam LPAI menyebabkan kematian yang beragam antara 48 hingga 96 jam pascapropagasi pada TAB. Zhang *et al.* (2008) menambahkan, virus unggas selain AI juga mampu menyebabkan kematian embrio. Virus tersebut meliputi infectious bronchitis virus (IBV), Newcastle disease virus (NDV), infectious bursal disease (IBDV) dan beberapa virus unggas lainnya.

Pasase dilakukan terhadap kelompok sampel yang tidak menyebabkan kematian embrio di propagasi awal. Hasil menunjukkan bahwa 15 sampel tetap tidak menyebabkan kematian embrio hingga pasase ketiga. Hasil pengamatan terhadap embrio menunjukkan kelompok sampel ini tidak mengalami perubahan patologi. Pada kelompok ini, cairan alantois tidak dilakukan uji HA.

Hasil Uji Hemaglutinasi (HA) *Direct* dan Mikro

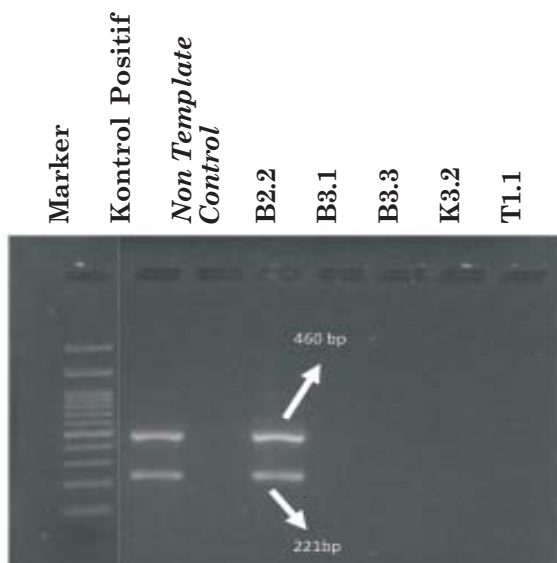
Hasil uji hemaglutinasi (HA) *direct* dan HA mikro menunjukkan bahwa lima dari 12

kelompok (cairan alantois dari TAB yang mengakibatkan kematian embrio) dapat mengaglutinasi sel darah merah (SDM) ayam. Hal ini mengindikasikan bahwa di dalam cairan alantois terdapat virus yang memiliki protein permukaan yang dapat mengaglutinasi SDM. Kammon *et al.*, (2015) menyatakan bahwa virus yang memiliki kemampuan aglutinasi SDM adalah golongan *avian influenza* dan NDV. *Avian influenza* memiliki protein hemaglutinin (HA) sedangkan NDV memiliki protein HN yang keduanya memiliki kemampuan mengikat sel darah merah (SDM). *Mean death time* (MD) embrio pada penelitian ini adalah 86 jam, Nilai HA log 2 adalah 6–8 HAU pada uji HA mikro mengindikasikan bahwa virus yang menyebabkan kematian embrio tersebut memiliki kemampuan replikasi yang baik pada TAB. Mehle dan Daudna (2010) menambahkan bahwa kemampuan replikasi virus pada TAB dipengaruhi oleh banyak faktor, salah satunya adalah tingkat keganasan agen virus itu sendiri.

Di sisi lain, uji HA *direct* dan mikro juga menunjukkan bahwa terdapat sampel lain yang mengakibatkan kematian embrio namun menunjukkan hasil negatif pada kedua uji tersebut. Diduga terdapat agen infeksi lain seperti IBV, IBDV atau virus lainnya yang mengakibatkan kematian embrio. Virus-virus tersebut tidak memiliki kemampuan mengaglutinasi SDM karena tidak memiliki protein permukaan yang mampu berikatan dengan reseptor dari SDM. Dalam penelitian ini, kelompok sampel ini tidak diuji lebih lanjut.

Hasil Identifikasi melalui RT-PCR

Visualisasi hasil RT-PCR pada gel elektroforesis dari gen H9 dan N2 menghasilkan amplicon sebesar 221 bp dan 460 bp. Hasil RT-PCR menunjukkan bahwa hanya satu sampel yang menunjukkan hasil positif mengandung gen H9 dan N2 (Gambar 1). Sampel tersebut adalah sampel dengan kode B2.2 yang diisolasi dari *swab* kloaka ayam petelur di Kecamatan Pongok, Kabupaten Blitar, Jawa Timur, sedangkan empat sampel lain menunjukkan hasil negatif pada uji RT-PCR. Dalam penelitian ini digunakan primer spesifik yang mampu mendeteksi H9 dan N2 dari subtipe H9N2, sehingga apabila dalam uji *duplex* muncul dua pita garis jingga, disimpulkan bahwa sampel tersebut mengandung virus *avian influenza* H9N2. Mosleh *et al.* (2017) menambahkan bahwa melalui RT-PCR sudah cukup untuk mendiagnosis suatu agen infeksius, dalam hal ini adalah VAI subtipe H9N2.

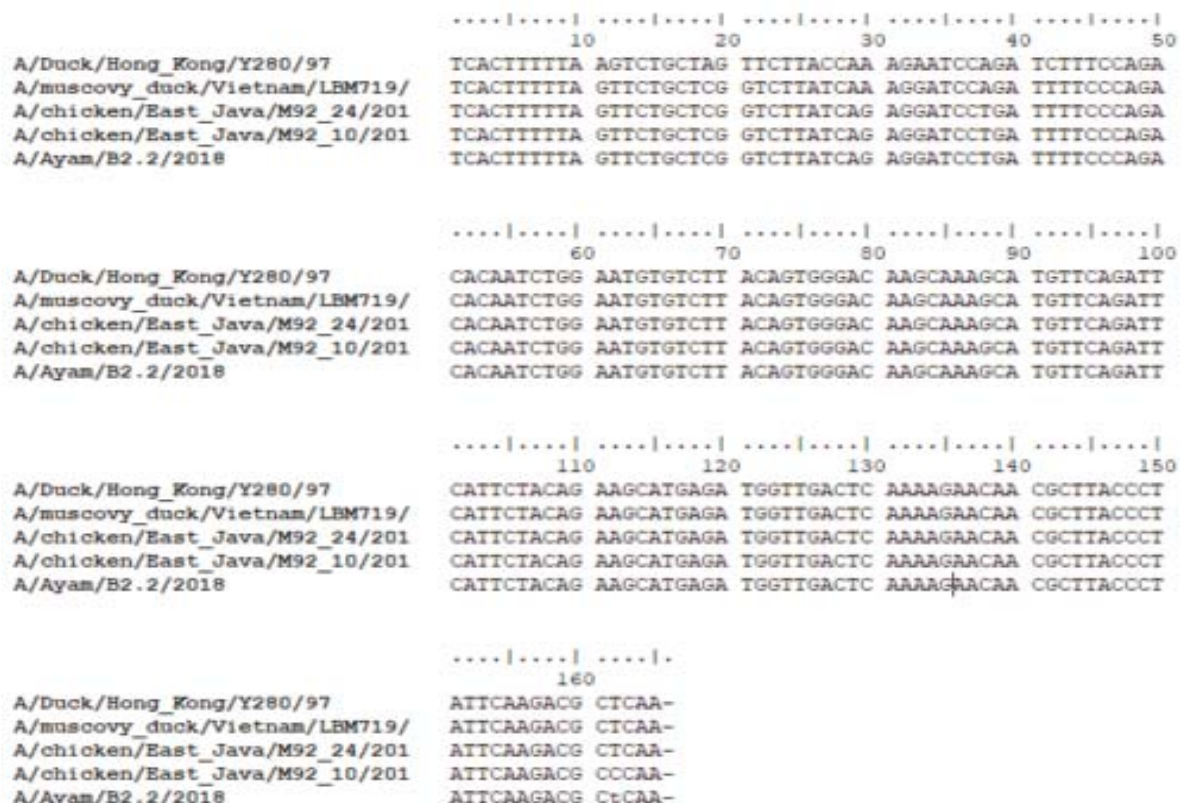


Gambar 1. Visualisasi produk PCR terhadap gen H9 (221 bp) dan N2 (460 bp) sampel penelitian pada gel agarose. Hasil elektroforesis menunjukkan dari lima sampel (positif pada uji HA), hanya satu sampel yang positif gen H9 dan N2, yakni kode B2.2.

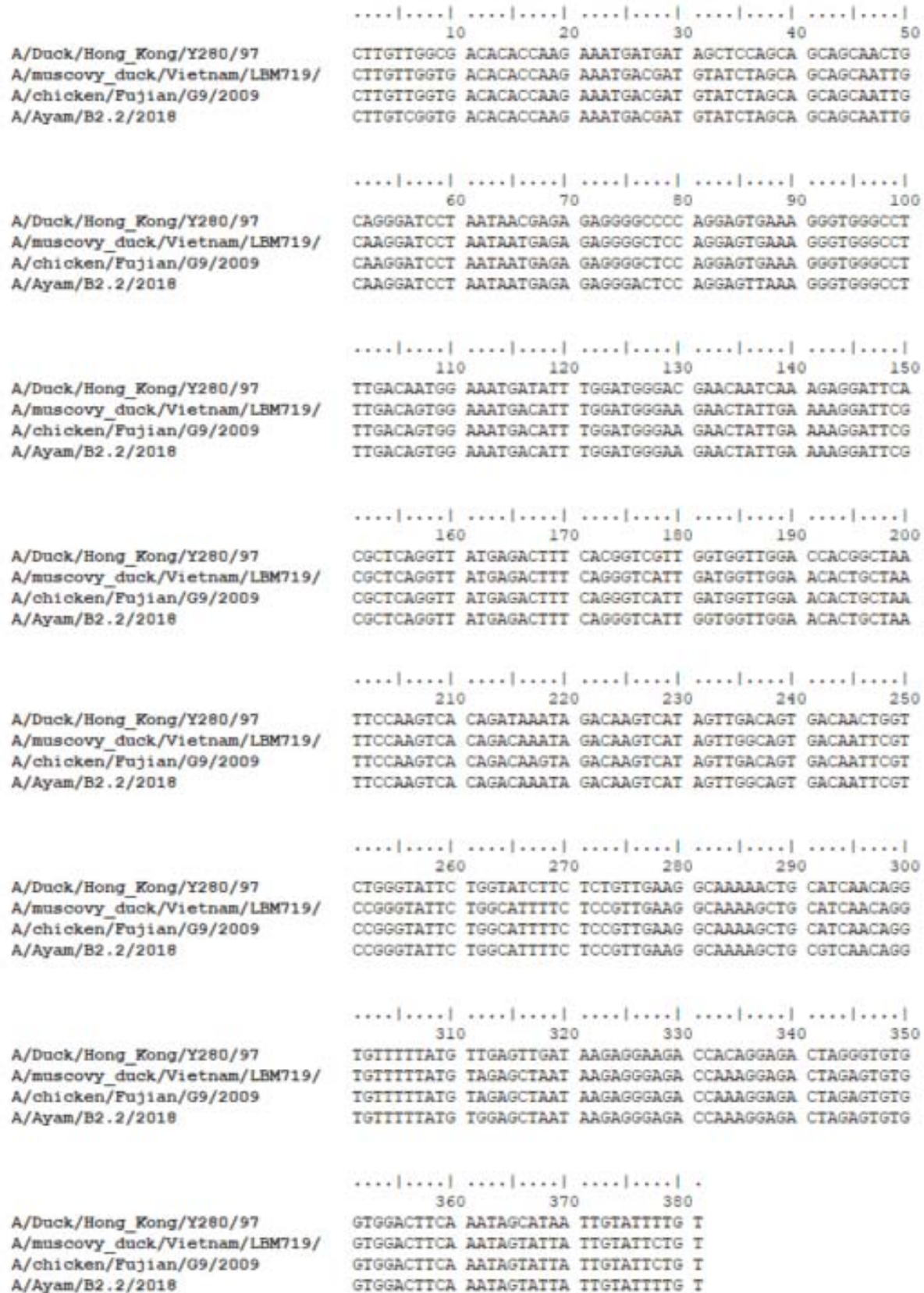
Hasil Analisis Homologi dan Filogenetik

Analisis homologi dilakukan dengan *pairwise comparison* yang membandingkan urutan nukleotida gen parsial HA (Gambar 2) dan NA (Gambar 3) dari isolat B2.2 dengan strain virus perwakilan dari masing-masing clade H9N2. Hasil *pairwise comparison* menunjukkan bahwa gen HA parsial dari isolat B2.2 asal Blitar 96,96 % identik dengan gen HA virus A/duck/Hongkong/Y280/1997 atau biasa dikenal dengan *lineage* Y280. Apabila dibandingkan dengan isolat lain yang tersedia di *GenBank*, isolat dalam penelitian ini identik 99,43-100%, termasuk isolat lain asal Indonesia. Sementara itu hasil *pairwise comparison* menunjukkan bahwa gen NA parsial dari isolat B2.2 asal Blitar 94,37% identik dengan gen HA virus A/duck/Hongkong/Y280/1997. Apabila dibandingkan dengan isolat lain yang tersedia di *GenBank*, isolat dalam penelitian ini identik 98,95-99,28%

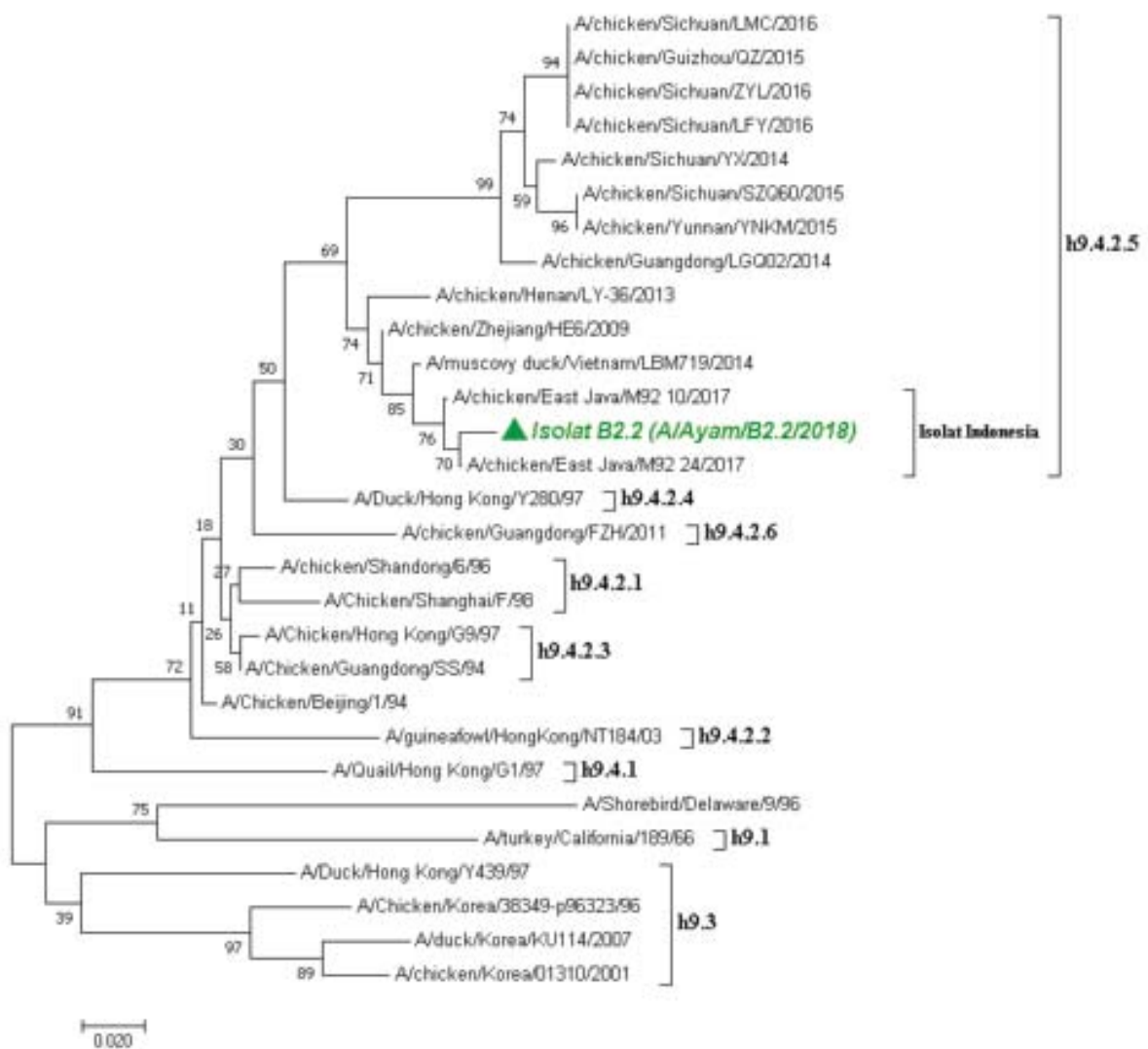
Substitusi (*random mutation*) terjadi pada beberapa nukleotida gen HA dan NA isolate B2.2 pada penelitian ini. Belum diketahui mengenai



Gambar 2. Hasil sekuensing gen hemaglutinin (HA) parsial berupa nukleotida isolat A/Ayam/B2.2/2018 yang disejajarkan dengan isolat lineage Y280 lainnya termasuk data Indonesia yang tersedia di GenBank. Hasil menunjukkan isolat A/Ayam/B2.2/2018 identik 96.96% dengan A/Duck/Hong_Kong/Y280/97, 99.43% dengan A/muscovy_duck/Vietnam/LBM719/14 dan 99.72–100% dengan isolat Indonesia.



Gambar 3. Hasil sekuensing gen neuraminidase (NA) parsial berupa nukleotida isolat A/Ayam/B2.2/2018 yang disejajarkan dengan isolat lineage Y280 lainnya.



Gambar 4. Kekerbatan filogenetik gen Hemaglutinin (HA) parsial VAI subtipe H9N2 yang diisolasi dari peternakan ayam petelur di Blitar. Isolat B2.2 (A/Ayam/B2.2/2018) masuk dalam *clade* h9.4.2.5 dan ditandai dengan ▲

penyebab terjadinya substitusi pada penelitian ini. Mutasi pada dasarnya dapat terjadi secara *antigenic drift* dan *antigenic shift* yang dapat dibedakan berdasarkan jangka waktu mutasi. *Antigenic drift* yang mungkin terjadi pada penelitian ini dimungkinkan karena pengaruh perlawanan virus terhadap kekebalan tubuh inang. Genetik virus akan berubah seiring proses adaptasi agar mampu menginfeksi inang. Proses *pasase* secara alami di lapangan juga berpengaruh terhadap terjadinya *antigenic drift* secara cepat (Shanmuganatham *et al.*, 2013)

Data *sequence* dapat digunakan sebagai karakter dan status karakter dalam penyusunan hubungan kekerabatan. Hubungan kekerabatan

digambarkan dalam suatu diagram bercabang yang disebut sebagai pohon filogenetik atau *cladogram*. Garis percabangan pada pohon filogenetik disebut sebagai *lineages* atau *clades* yang menggambarkan garis evolusi atau nenek moyang berdasarkan kesamaan karakter. Dalam penelitian ini, analisis secara filogenetik bertujuan untuk mengetahui garis asal dari virus *avian influenza* subtype H9N2 pada penelitian ini, sehingga memberikan gambaran kedekatan serta menelusuri kemungkinan asal masuknya virus tersebut ke Indonesia.

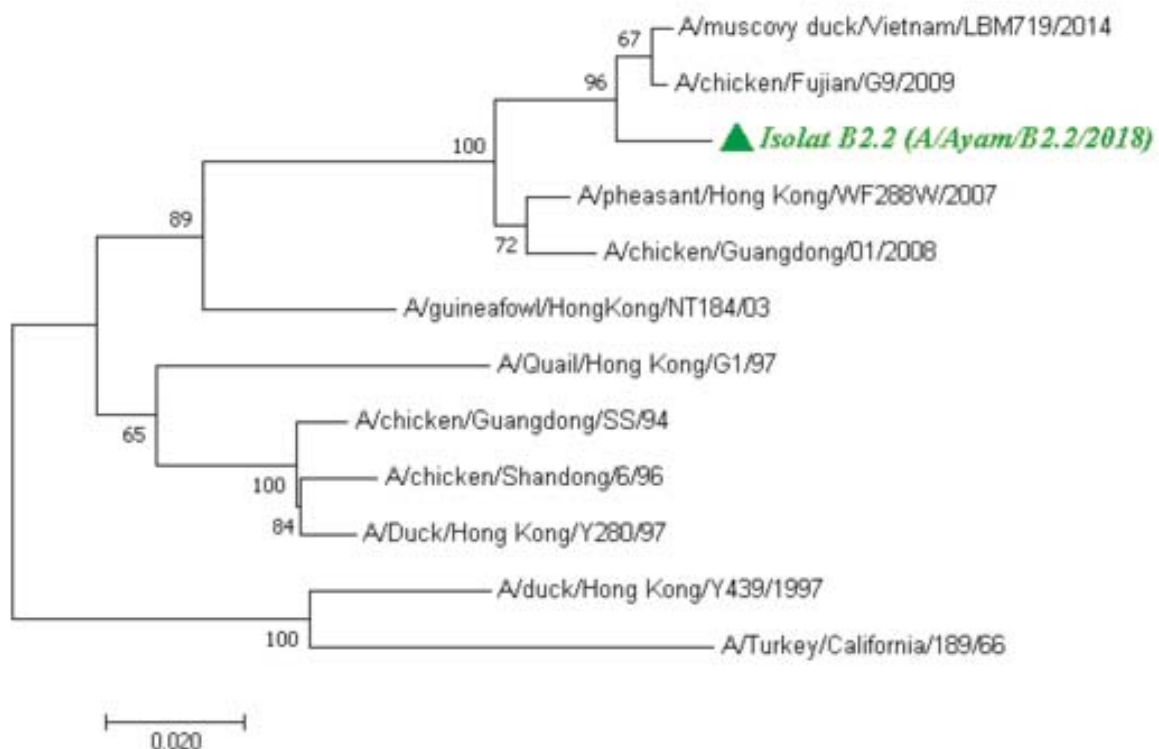
Berdasarkan hasil analisis nukleotida, isolat penelitian kode B2.2 masuk dalam *clade* h9.4.2.5. Menurut Shen *et al.* (2015), data

karakterisasi sub tipe H9N2 di dunia sangat terbatas, namun secara garis besar H9N2 terbagi menjadi *lineage* G1 dan *lineage* Y280. Secara umum yang termasuk lineage G1 adalah clade h9.4.1 yang tersebar di wilayah Pakistan, India, Iran dan Israel, sedangkan clade turunan h9.4.2 masuk dalam lineage Y280 yang umumnya merupakan isolat dari China. Secara kronologi, H9N2 sebelum tahun 2007 tergolong dalam clade h9.4.2.1–h9.4.2.4. Pada sekitar tahun 2010, diwakili oleh isolat A/chicken/Guangxi/55/2005 muncul clade h9.4.2.5, yang antara tahun 2013 dan 2015 mengandung reseptor yang bersifat infeksius silang, cenderung berikatan dengan reseptor mamalia.

Menurut Wan dan Perez, (2007) secara umum, clade h9.4.2.5 mengandung asam amino *Leucine* (L) pada posisi nukleotida ke-216 dari gen hemaglutinin. Asam amino pada posisi tersebut cenderung diisolasi dari H2 dan H3 yang umumnya menginfeksi mamalia termasuk manusia. Gen HA yang mengandung L cenderung berikatan dengan *sialyl- α 2,6-galactose* yang merupakan reseptor dari mamalia, sedangkan pada umumnya unggas memiliki asam amino Q pada tempat yang sama. Dalam penelitian ini tidak terkarakterisasi asam

amino yang dimiliki oleh isolat B2.2 oleh karena penggunaan primer gen parsial dari HA virus. Untuk mengetahui lebih lanjut sifat dari virus B2.2 dibutuhkan sekuensing gen HA secara utuh agar diketahui posisi-posisi penting seperti *receptor binding site*, *antigenic site* hingga *N-glycosylation site* yang masing-masing berperan penting pada sistem infeksi virus *avian influenza*.

Berdasarkan hasil filogenetik gen HA (Gambar 4 dan 5), isolat B2.2 asal Blitar memiliki kedekatan dengan isolat asal Vietnam yang bersirkulasi sekitar tahun 2014 yakni LBM719/2014 yang diisolasi dari *muscovy duck*. Berdasarkan beberapa penelitian, yang menyebabkan masuknya sub tipe baru *avian influenza* ke suatu wilayah antara lain burung liar sebagai resevoir alami, perdagangan bahan asal unggas dari negara endemik ke wilayah bebas serta perdagangan unggas hidup dari negara endemik ke negara bebas (Kalthoff *et al.*, 2010; Yuan *et al.*, 2014). Penelitian lebih lanjut dibutuhkan untuk mengetahui jalan masuknya sub tipe H9N2 ke wilayah Indonesia. Di sisi lain, tidak tampak adanya pembagian *clade* berdasarkan gen NA dari sub tipe H9N2 (Gambar 5). Vaksinasi merupakan cara optimal yang



Gambar 5. Kekerabatan filogenetik gen Neuraminidase (NA) parsial VAI sub tipe H9N2 yang diisolasi dari peternakan ayam petelur di Blitar.

dapat diterapkan untuk mencegah kerugian besar akibat infeksi subtype H9N2 pada suatu peternakan. Melalui vaksinasi yang tepat, dapat menimbulkan reaksi antibodi yang sesuai sehingga mampu mencegah terjadinya *shedding* yang berakibat pada peningkatan sirkulasi virus pada peternakan (Li *et al.*, 2005). Dengan diketahuinya relasi genetik melalui pohon filogenetik dapat membantu dalam menentukan vaksin yang digunakan, namun karakterisasi lebih dalam tetap diperlukan untuk menentukan *seed* yang akan digunakan.

SIMPULAN

Virus avian influenza subtype H9N2 berhasil diisolasi dari peternakan ayam petelur di Kabupaten Blitar, Jawa Timur. Isolat VAI H9N2 B2.2 asal Blitar termasuk dalam *clade* h9.4.2.5.

SARAN

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengkarakterisasi bagian penuh dari Hemagglutinin dan Neuraminidase isolat Blitar sehingga tergambarkan tingkat patogen berdasarkan asam amino yang menyandi kedua protein permukaan tersebut.

DAFTAR PUSTAKA

- Abid M, Yaqub T, Mehboob A, Shabbir MZ. 2017. Characterization and phylogenetic analysis of avian influenza virus subtype H9N2 in Pakistan. *Hosts and Viruses*. 4(4):62–69.
- Alexander DJ. 2007. An overview of the epidemiology of avian influenza. *Vaccine* 25: 5637–5644
- Cattoli G, Milani A, Temperton N. 2011. Antigenic drift in H5N1 avian influenza virus in poultry is driven by mutations in major antigenic sites of the hemagglutinin molecule analogous to those for human influenza virus. *J Virol* 85(17): 8718–8724.
- Chaharaein B, Omara AR, Aini I, Yusoff K, Hassan SS. 2009. Detection of H5, H7 and H9 subtypes of avian influenza viruses by multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction. *J Els Microbial Res*. 164(2):174–179.
- Chen H, Yuan H, Gao R, Zhang J, Wang D, Xiong Y, Fan G, Yang F, Li X, Zhou J, Zou S, Yang L, Chen T, Dong L, Bo H, Zhao X, Zhang Y, Lan Y, Bai T, Dong J, Li Q, Wang S, Zhang Y, Li H, Gong T, Shi Y, Ni X, Li J, Zhou J, Fan J, Wu J, Zhou X, Hu M, Wan J, Yang W, Li D, Wu G, Feng Z, Gao GF, Wang Y, Jin Q, Liu M, Shu Y. 2014. Clinical and epidemiological characteristics of a fatal case of avian influenza A H10N8 virus infection: a descriptive study. *Lancet* 383: 714–721
- Easterday BC, Hinshaw VS, Halvorson DA. 1997. Influenza. In: Calnek BW, Barnes HJ, Beard CW, McDougald LR, Saif YM, editors. *Diseases of Poultry*. 10th ed. Ames, IA: Iowa State University Press. Hlm. 583–605.
- Kalthoff D, Anja G, Martin B. 2010. (Highly pathogenic) avian influenza as a zoonotic agent. *J Vet Microbiol* 140: 237–245.
- Kammon A, Heidari A, Dayhum A, Eldaghayes I, Sharif M, Monne I, Cattoli G, Asheg A, Farhat M, Kraim E. 2015. Characterization of Avian Influenza and Newcastle disease viruses from Poultry in Libya. *Avian Dis* 59: 422–430
- Li C, Yu K, Tian G, Yu D, Liu L, Jing B, Ping J, Chen H. 2005. Evolution of H9N2 influenza viruses from domestic poultry in Mainland China. *Virology* 340(1): 70–83.
- Liu JH, Okazaki K, Shi WM, Wu QM, Mweene AS, Kida H. 2003. Phylogenetic analysis of neuraminidase gene of H9N2 influenza viruses prevalent in chickens in China during 1995–2002. *Virus Genes* 27: 197–202
- Mehle A, Doudna JA. 2010. A host of factors regulating influenza virus replication. *Replication Viruses* 2(2): 566–73. doi: 10.3390/v2020566.
- Mosleh N, Dadras H, Asasi K, Taebipour MJ, Tohidifar SS, Farjanikish G. 2017. Evaluation of the timing of the *Escherichia coli* co-infection on pathogenicity of H9N2 avian influenza virus in broiler chickens. *Iran J Vet Res* 18(2): 86–91.
- Noda T, Sagara H, Yen A, Takada A, Kida H, Cheng RH, Kawaoka Y. 2006. Architecture of ribonucleoprotein complexes in influenza A virus particles. *Nature* 439: 490–492

- Qingfeng S, Qianli W, Liwen J, Haiyan, Yue C, Lufang J, Qingwu J. 2016. Biological Characteristics of H9N2 Avian Influenza Viruses from Healthy Chickens in Shanghai, China. *Med Sci Monit* 22: 4844–4853.
- Shanmuganatham K, Feeroz MM, Jones-Engel L, Smith GJ, Fourment M, Walker D, McClenaghan L, Alam SM, Hasan MK, Seiler P, Franks J, Danner A, Barman S, McKenzie P, Krauss S, Webby RJ, Webster RG. 2013. Antigenic and molecular characterization of avian influenza A(H9N2) viruses, Bangladesh. *Emerg Infect Dis* 19(9): 1393–1402.
- Shen HQ, Yan ZQ, Zeng FG, Liao CT, Zhou QF, Qin JP, Chen F. 2015. Isolation and phylogenetic analysis of hemagglutinin gene of H9N2 influenza viruses from chickens in South Cina from 2012 to 2013. *J Vet Sci* 16(3): 317–324.
- Sun Y, Liu J. 2015. H9N2 influenza virus in China: a cause of concern. *Protein Cell* 6: 18–25
- Uhlendorff J, Matrosovich T, Klenk HD, Matrosovich M. 2009. Functional significance of the hemadsorption activity of influenza virus neuraminidase and its alteration in pandemic viruses. *Arch Virol* 154: 945–957. doi: 10.1007/s00705-009-0393-x.
- Wan H, Perez DR. 2007. Amino acid 226 in the hemagglutinin of H9N2 influenza viruses determines cell tropism and replication in human airway epithelial cells. *Virology* 361: 5181–5191.
- Yuan J, Dong Y, Hongguang R, Zhiqiu Y, Zhisong H, Mingda H, Beiping L, Wei Z, Junjie Y, Long L. 2014. Phylogeography of avian influenza A H9N2 in Cina. *Vet Res Biomed Central* 15: 1110.
- Zalizar L, Pancapalaga W, Indratmi D. 2016. Potensi ekonomi pemakaian antelmintika pada peternakan ayam petelur. Seminar Nasional dan Gelar Produk. UMM. 17-18 Oktober 2016. UMM
- Zhang P, Tang Y, Liu X, Peng D, Liu W, Liu H, Lu S, Liu X. 2008. Characterization of H9N2 influenza viruses isolated from vaccinated flocks in an integrated broiler chicken operation in eastern China during a 5 year period (1998-2002). *J Gen Virol* 89(2): 3102-3112.
- Zhu Y, Yang Y, Liu W, et al. 2015. Comparison of biological characteristics of H9N2 avian influenza viruses isolated from different hosts. *Arch Virol*. 160:917–27.